维生素 A 对奶牛乳腺上皮细胞乳脂和乳蛋白合成相关基因表达的影响

苏　茵　刘　阳　闫素梅*　史彬林　赵艳丽　石惠宇

（内蒙古农业大学动物科学学院，呼和浩特 010018）

摘　要：本试验旨在研究维生素 A 对奶牛乳腺上皮细胞（BMECs）内乳脂和乳蛋白合成相关基因表达的影响。采用单因素完全随机试验设计，将第 3 代 BMECs 随机分为 6 个处理，每个处理 6 个重复，使用无血清培养基饥饿 24 h 后，采用维生素 A 浓度分别为 0（对照）、0.05、0.10、0.20、1.00 和 2.00 μg/mL 的培养基培养 24 h。结果表明：与对照组相比，1.00、2.00 μg/mL 维生素 A 可以显著提高相对增殖率以及甘油三酯（TG）含量（$P<0.05$）；维生素 A 能显著提高乳脂合成相关基因过氧化酶体增殖物激活受体 γ（*PPARG*，0.05、0.10、0.20、1.00 和 2.00 μg/mL）、固醇调节元件结合蛋白 1（*SREBP*1，0.05、0.10 μg/mL）、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶（*SCD*，0.05、0.10 μg/mL）的基因表达量（$P<0.05$）；维生素 A 也能显著提高乳蛋白合成相关基因信号转导转录激活因子 5（*STAT*5，0.20 μg/mL）、αs1-酪蛋白（*CSN*1*S*1，0.05 和 0.10 μg/mL）、κ-酪蛋白（*CSN*3，0.10 μg/mL）基因表达量（$P<0.05$）；维生素 A 也能显著提高乳脂合成相关酶乙酰辅酶 A 羧化酶（ACACA）活性（0.05、0.10、0.20 和 1.00 μg/mL）（$P<0.05$）。结果提示，维生素 A 对 BMECs 内乳脂、乳蛋白合成相关基因表达的促进效果呈浓度依赖性，以 0.10 μg/mL 维生素 A 效果较好。

关键词：维生素 A；乳脂；乳蛋白；基因表达

中图分类号：S823

乳脂和乳蛋白作为牛奶的主要成分，是衡量乳制品的重要营养指标。维生素 A（vitamin A）是维持动物机体正常生理代谢的必需营养素之一。维生素 A 能通过调控多种基因的表达来影响动物机体的生长发育、免疫及代谢，也能对多种动物的脂类代谢产生影响。王文娟等[1]发现饲粮维生素 A 水平的降低会提高牛肉大理石花纹的得分，而 Arnett 等[2]结果表明，羔羊饲粮中补饲高水平的维生素 A 112 d 可以提高其总肌内脂肪含量；丁明岩[3]研究发现，在石斑鱼饲料中添加 2 000~4 000 IU/kg 维生素 A 时，脂类分解代谢得到显著提高，显著高于 0 和 2 000 IU/kg 组。这些结果说明维生素 A 对动物的脂类代谢有显著的影响。Oldman 等[4]

收稿日期：2018-02-01

基金项目：国家自然科学基金（31160466）

作者简介：苏　茵（1993-），女，内蒙古乌兰察布人，硕士研究生，从事反刍动物营养研究。E-mall: 654916601@qq.com

*通信作者：闫素梅，教授，博士生导师，E-mail: yansmimau@163.com

研究表明，在分娩前 60 d 到产后 42 d，奶牛饲喂 170 000 IU/d 的维生素 A 与饲喂 50 000 IU/d 的维生素 A 相比，产奶量显著提高，包括乳脂、乳蛋白等在内的乳成分的合成也增加。本课题组前期研究发现，饲粮中添加高剂量（220 IU/kg BW）的过瘤胃保护维生素 A，奶牛产奶量、乳脂率、乳蛋白率以及日均乳脂产量和乳蛋白产量有高于低剂量（110 IU/kg BW）组的趋势[5]。然而，关于维生素 A 是否对奶牛的乳脂、乳蛋白合成产生影响的报道甚少。奶牛乳腺上皮细胞（bovine mammary epithelial cells，BMECs）是乳脂和乳蛋白合成与分泌的重要场所，其细胞的生物合成能力决定了奶牛乳腺的泌乳能力。因此，本试验选用 BMECs 为模型，以乳脂和乳蛋白合成相关酶活性及基因表达量为考察指标，研究维生素 A 对乳脂和乳蛋白合成的影响，为奶牛生产中维生素 A 的合理添加以及改善乳成分的组成提供依据。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

胶原酶Ⅱ（17101-015）、DMEM/F12 基础培养基（12400-024）、胰岛素转铁蛋白硒钠（51500-056）、胎牛血清（FBS，10099-141）、胰蛋白酶／乙二胺四乙酸（EDTA，25300054）和双抗（15140-122）购自 Gibco 公司；两性霉素 B（AE437）、催乳素（PRL，L6520）、视黄酸（RA，R2625）、表皮生长因子（EGF，E4127）、氢化可的松（IJ0135）购自 Sigma 公司；四甲基偶氮唑盐（MTT）、二甲基亚砜（DMSO）购自 Amresco 公司；磷酸盐缓冲溶液（PBS）购自 HyClone 公司；PrimeScript^{TM} RT Master Mix（DRR036A）、SYBR Premix Ex Tag^{TM} Ⅱ（DRR820A）、RNAiso Plus（D9109B）购自宝生物工程（大连）有限公司；氯仿、无水乙醇、异丙醇购自天津市风船化学试剂科技有限公司。

1.2　试剂配制

生长培养基：在每 100 mL DMEM/F12 基础培养基中添加 FBS 10 mL，双抗 2 mL，胰岛素转铁蛋白硒钠 0.5 mL，PRL、两性霉素 B 和氢化可的松各 100 μL 及 EGF 10 μL。

维生素 A 贮备液的配制：将 100 mg RA（维生素 A 的主要活性代谢物质）溶于 5 mL DMSO 溶液，配制成 20.00 mg/mL 维生素 A 原液，再将其稀释成浓度分别为 0、0.05、0.10、0.20、1.00 和 2.00 mg/mL 的维生素 A 贮备液，0.22 μmol/L 滤器过滤。

1.3　BMECs 的培养

BMECs 培养采用胶原酶消化法。从屠宰场取健康荷斯坦奶牛乳腺组织低温保存运回实验室，剪为 1 cm×1 cm×1 cm 大小的组织块，用 3×双抗 PBS 将其清洗 3 遍，75%酒精清洗 30 s，1×双抗 PBS 清洗 3 遍，剪取腺泡丰富的部位放入 5 mL 无酶无菌离心管中，剪碎至糊状后加入等体积 0.5%的胶原酶Ⅱ，37 ℃消化 1 h，每 20 min 上下颠倒混匀，使其充分消化。80 目滤网过滤，172×*g* 离心 5 min，PBS 冲洗 1 次，再离心细胞 3 min，之后用生长培养基悬浮接种于 25 cm 透气细胞瓶内，于 37 ℃ 5% CO_2 培养箱中培养直至细胞贴壁至 90%，之后用 0.05%胰蛋白酶/EDTA 纯化和传代细胞。

1.4 试验设计

试验采用单因素完全随机试验设计，将贴壁生长的第 3 代 BMECs 随机分为 6 个处理，每个处理 6 个重复。使用无血清培养基饥饿处理 24 h 后，添加维生素 A 浓度分别为 0、0.05、0.10、0.20、1.00 和 2.00 μg/mL 的培养基，其中 0 μg/mL 维生素 A 组为对照组，继续培养 24 h 后按照试验要求的细胞收集方法进行细胞收集和相关指标的测定。

1.5 测定指标与方法

细胞活力用 MTT 比色法[6]检测，以细胞相对增殖率（RGR）表示。在培养结束前 4 h，每孔加入 20 μL MTT，4 h 后弃上清，每孔加入 100 μL DMSO，振荡 10 min 后，用全自动酶标仪检测 490 nm 波长下各培养孔的吸光度（OD）值。

$$\text{RGR（\%）}=（\text{试验组 }OD_{490\ nm}/\text{对照组 }OD_{490\ nm}）\times 100。$$

细胞内甘油三酯（TG）含量依照试剂盒（E1013，北京普利莱基因技术有限公司）说明书要求进行测定。细胞培养结束后弃上清，用 PBS 洗涤 2 次，每孔加入 200 μL 裂解液作用 10 min，收集裂解液于 1.5 mL 离心管中，1 200×*g* 离心 5 min，取上清 70 ℃加热 10 min，424×*g* 离心 5 min 后取上层清液进行测定。

以磷酸甘油醛脱氢酶（*GAPDH*）作为内参基因，采用实时荧光定量 PCR 仪（ABI-7500，ABI 公司）测定细胞内乳脂、乳蛋白合成相关基因的表达量。测定基因主要包括乳脂合成相关基因脂肪酸合成酶（*FASN*）、乙酰辅酶 A 羧化酶（*ACACA*）、脂酰辅酶 A 去饱和酶（*SCD*）、脂蛋白酯酶（*LPL*）、脂肪酸结合蛋白 3（*FABP*3）、固醇调节元件结合蛋白 1（*SREBP*1）、过氧化酶体增殖物激活受体 γ（*PPARG*），乳蛋白合成相关基因αs1-酪蛋白（*CSN*1*S*1）、β-酪蛋白（*CSN*2）、κ-酪蛋白（*CSN*3）、真核起始因子 4E（*eIF4E*）、真核起始因子 4E 结合蛋白 1（4*EBP*1）、雷帕霉素靶蛋白（*mTOR*）、p70 核糖体蛋白 S6 激酶 1（*S6K*1）、信

号传导和转录激活因子 5（*STAT5*），其引物序列及参数见表 1。反应程序为：95 ℃变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 20 s，进行 40 个循环；72 ℃延伸 7 min；溶解曲线为：70~95 ℃，每 6 s 升温 0.5 ℃，共 51 个循环，基因的表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。

表 1　引物序列及参数

Table1　Primer sequence and parameters

基因 Genes	引物序列 Primer sequences（5′-3′）	GenBank 登录号 GenBank accession No.	长度 Length/bp	退火温度 Tm/℃	来源 Sources
磷酸甘油醛脱氢酶 *GAPDH*	F:GGGTCATCATCTCTGCACCT R:GCTCATAAGTCCCTCCACGA	XM-001252479	177	60	Zhou 等[7]
脂肪酸合成酶 *FASN*	F:AGGACCTCGTGAAGGCTGTGA R:CCAAGGTCTGAAAGCGAGCTG	NM-001012669	85	62	自行设计
乙酰辅酶 A 羧化酶 *ACACA*	F:CATCTTGTCCGAAACGTCGAT R:CCCTTCGAACATACACCTCCA	AJ132890	101	58	Bionaz 等[8]
硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 *SCD*	F:TCCTGTTGTTGTGCTTCATCC R:GGCATAACGGAATAAGGTGGC`	AY241933	101	58	Bionaz 等[8]
脂肪酸结合蛋白 3 *FABP3*	F:GAACTCGACTCCCAGCTTGAA R:GCTTTGACACCCGAGTAACG	DN518905	102	62	Bionaz 等[8]
脂蛋白酯酶 *LPL*	F:ACACAGCTGAGGACACTTGCC R:AAGCCTACCACAATCATCGAAG	BC118091	101	60	Bionaz 等[8]
过氧化酶体增殖物激活受体γ *PPARG*	F:CCAAATATCGGTGGGAGTCG R:GCCATGGATCACCACAAAGG	NM-181024	101	62	Bionaz 等[8]
固醇调节元件结合蛋白 1 *SREBP*1	F:CTGACGACCGTGAAAACAGA R:ACAGCGAAGGGCTCACTCTC	NM-001113302	334	60	张养东[9]
αs1-酪蛋白 *CSN*1*S*1	F:ACATCCTATCAAGCACCAAGGACTC R:AGACGGCAGATTTATTCAACTT	NM-181029	192	60	自行设计
κ-酪蛋白 *CSN*3	F:CCAGGAGCAAAACCAAGAAC R:GACGAAATGCTTTCAGCTTCCA	NM-174294	148	56	Zhou 等[7]
雷帕霉素靶蛋白 *mTOR*	F:TGAACTGGAGGCTGATGGACAC R:TGCAACTGGTTTCTGTTGGT	XM-001788228	83	58	自行设计
真核起始因子 4E 结合蛋白 1 4*EBP*1	F:GGCAGGCGGTGAAGAGTC R:TGACTGGCCAGCAGAGTAGGAA	BC120290	302	58	张养东[9]
p70 核糖体蛋白 S6 激酶 1 *S6K*1	F:CAAGCTTGCATGCTAATTTCTCC R:CCTGGGCTGCGGGAT	DN544771	101	62	Bionaz 等[8]
信号转导转录激活因子 5 *STAT5*	F:AAGACCCAGACCAAGTTCGC R:TTGAGTCCTGATCATGTCGAAGA	NM-001012673	422	60	自行设计
真核起始因子 4E *eIF4E*	F:GAAGACTTTTGGGCTCTGTAC R:CAGCTCCACATACATCATCAC	NM-174310.3	82	60	自行设计
β-酪蛋白 *CSN*2	F:TCTGCCTCTGCTCCAGTCTT R:AGGAGGGGGCATTCACTTT	M-64755.1	116	60	自行设计

F:上游引物；R:下游引物。

F: forward primer； R: reverse primer.

乳脂和乳蛋白合成相关酶活性和蛋白含量按照酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒的操作说明书进行，主要包括 BMECs 内乳脂合成相关酶 FASN、ACACA、LPL、SCD 的活性，乳蛋白合成相关酶 S6K1 的活性以及 mTOR 的含量。

1.6 数据统计分析

试验数据使用 SAS 9.0 软件 ANOVA 程序进行方差分析，并用 Duncan 氏法进行多重比较。P<0.05 为差异显著判断标准，0.05≤P<0.10 为差异趋于显著判断标准。

2 结 果

2.1 RGR、TG 含量和乳脂合成相关基因的表达

由表 1 可知，1.00、2.00 μg/mL 维生素 A 组的 RGR 和 TG 含量显著高于对照组（P<0.05）。对于 *FASN* 基因表达量，以 0.10 μg/mL 维生素 A 组最高，显著高于对照组（P<0.05），与 0.05 μg/mL 维生素 A 组差异不显著（P>0.05）；对于 *ACACA* 基因表达量，除 2.00 μg/mL 维生素 A 组外的所有维生素 A 组均显著高于对照组（P<0.05），且以 0.10 μg/mL 维生素 A 组最高；所有维生素 A 组的 *PPARG* 基因表达量显著高于对照组（P<0.05），以 1.00 μg/mL 维生素 A 组最高；对于 *SREBP*1、*SCD* 基因表达量，以 0.05、0.10 μg/mL 维生素 A 组显著高于对照组（P<0.05），0.20、1.00、2.00 μg/mL 维生素 A 组与对照组无显著差异（P>0.05）。

表 1 维生素 A 对 BMECs 内 RGR、TG 含量和乳脂合成相关基因表达的影响

Table1 Effects of vitamin A on intracellular RGR， TG content and mRNA expression related to milk fat synthesis in BMECs

项目 Items	维生素 A 浓度 Vitamin A concentration/（μg/mL） 0	0.05	0.10	0.20	1.00	2.00	SEM	*P* 值 *P*-value
相对增殖率 RGR/%	100.00^{b}	98.65^{b}	99.42^{b}	99.31^{b}	117.08^{a}	117.32^{a}	0.01	<0.01
甘油三酯 TG/(μg/mg prot)	9.36^{b}	16.98^{b}	14.15^{b}	14.81^{b}	42.25^{a}	43.60^{a}	1.69	<0.01
脂肪酸合成酶 *FASN*	1.00^{c}	1.29^{ab}	1.43^{a}	1.12^{bc}	1.00^{c}	1.17^{abc}	0.07	0.01
乙酰辅酶 A 羧化酶 *ACACA*	1.00^{d}	1.48^{bc}	2.00^{a}	1.76^{ab}	1.57^{abc}	1.26^{cd}	0.14	<0.01
过氧化酶体增殖物激活受体γ *PPARG*	1.00^{b}	2.21^{a}	2.18^{a}	2.43^{a}	2.80^{a}	2.44^{a}	0.15	<0.01
固醇调节元件结合蛋白 1 *SREBP*1	1.00^{b}	8.16^{a}	10.07^{a}	2.73^{b}	3.80^{b}	1.65^{b}	0.79	<0.01

脂蛋白脂酶 *LPL*	1.00^{a}	0.90^{a}	1.23^{a}	1.07^{a}	1.11^{a}	0.70^{a}	0.06	0.14
硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 *SCD*	1.00^{b}	1.90^{a}	1.72^{a}	1.32^{ab}	1.29^{ab}	1.26^{ab}	0.16	0.03
脂肪酸结合蛋白 3 *FABP*3	1.00^{a}	0.85^{a}	0.75^{a}	0.73^{a}	0.76^{a}	0.69^{a}	0.04	0.34

同行数据相同或无字母肩标表示差异不显著（*P*>0.05），不同字母肩标表示差异显著（*P*<0.05）。下表同。

Values in the same row with the same or no letter superscripts mean no significant difference (*P*>0.05), while with different letter superscripts mean significant difference (*P*<0.05). The same as below.

2.2 乳蛋白合成相关基因的表达

由表 2 可知，0.05 和 0.10 μg/mL 维生素 A 组的 *CSN*1*S*1 基因表达量较高，显著高于对照组和其他维生素 A 组（*P*<0.05），且 0.20 和 1.00 μg/mL 维生素 A 组显著高于对照组。对于 *CSN*3 基因表达量，0.10 μg/mL 维生素 A 组显著高于对照组及 0.20、1.00、2.00 μg/mL 维生素 A 组（*P*<0.05），0.20、1.00 和 2.00 μg/mL 维生素 A 组与对照组无显著差异（*P*>0.05）；对于 *mTOR* 基因表达量，0.10 μg/mL 维生素 A 组显著高于对照组（*P*<0.05），其他维生素 A 组与对照组无显著差异（*P*>0.05）；对于 *STAT*5 基因表达量，以 0.05、0.10 和 0.20 μg/mL 维生素 A 组较高，尤以 0.20 μg/mL 维生素 A 组最高，显著高于对照组（*P*<0.05），其他各维生素 A 组与对照组无显著差异（*P*>0.05）；0.10、1.00 μg/mL 维生素 A 组的 *eIF*4*E* 基因表达量相比对照组有增加的趋势(*P*=0.07)。

表 2 维生素 A 对 BMECs 内乳蛋白合成相关基因表达的影响

Table 2 Effects of vitamin A on mRNA expression related to milk protein synthesis in BMECs

项目 Items	维生素 A 浓度 Vitamin A concentration/（μg/mL） 0	0.05	0.1	0.20	1.00	2.00	SEM	*P* 值 *P*-value
αs1-酪蛋白 *CSN*1*S*1	1.00^{d}	3.47^{a}	3.48^{a}	2.05^{bc}	2.45^{b}	1.33^{cd}	0.21	<0.01
β-酪蛋白 *CSN*2	1.00	1.46	1.22	1.29	1.73	0.58	0.17	0.50
κ-酪蛋白 *CSN*3	1.00^{b}	1.57^{ab}	2.12^{a}	1.32^{b}	1.31^{b}	1.07^{b}	0.09	0.02
雷帕霉素靶蛋白 *mTOR*	1.00^{b}	0.93^{b}	1.92^{a}	1.04^{b}	1.55^{ab}	1.03^{b}	0.20	0.04
真核起始因子 4E *eIF*4*E*	1.00	1.11	1.42	1.00	1.52	0.90	0.07	0.07
真核起始因子 4E 结合蛋白 1 4*EBP*1	1.00	0.51	0.83	0.84	0.93	0.85	0.09	0.69
p70 核糖体蛋白 S6 激酶 1 *S6K*1	1.00	0.96	1.31	0.93	1.00	0.77	0.07	0.54

信号转导转录激活因子 5 *STAT5*	1.00^{b}	2.64^{ab}	2.90^{ab}	4.43^{a}	1.62^{b}	1.64^{b}	0.32	0.03

2.3 乳脂和乳蛋白合成相关酶活性和蛋白含量

由表 2 可知，对于 ACACA 活性，除 2.00 μg/mL 维生素 A 组与对照组无显著差异（*P*>0.05）外，其他维生素 A 组均显著高于对照组（*P*<0.05），且以 0.10 μg/mL 维生素 A 组最高；维生素 A 对乳脂合成相关酶 FASN 和 LPL 活性无显著的影响（*P*>0.05），但从数值上看，0.05 和 0.10 μg/mL 维生素 A 组的 FASN 活性最高，且高于其他各组；SCD 的活性以 0.05、0.10 μg/mL 维生素 A 组趋于显著地高于对照组（*P*=0.08）；相比对照组，1.00 μg/mL 维生素 A 组提高了 mTOR 含量，但差异不显著（*P*>0.05），但显著高于 0.05、0.20 和 2.00 μg/mL 维生素 A 组（*P*<0.05）。0.10 和 1.00 μg/mL 维生素 A 组 S6K1 活性略高于其他各组，但差异不显著（*P*>0.05）。

表 3　维生素 A 对 BMECs 内乳脂和乳蛋白合成相关酶活性和蛋白含量的影响

Table3　Effects of vitamin A on enzyme activity and protein content related to milk fat and protein synthesis in BMECs

项目 Items	维生素 A 浓度 Vitamin A concentration/（μg/mL）						SEM	*P* 值 *P*-value
	0	0.05	0.10	0.20	1.00	2.00		
乙酰辅酶 A 羧化酶 ACACA/(U/L)	149.22^{c}	315.72^{b}	491.41^{a}	331.83^{b}	330.32^{b}	174.70^{c}	28.00	<0.001
脂肪酸合成酶 FASN/（U/L）	24.07	30.17	30.06	13.90	23.10	27.83	8.74	0.93
硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 SCD/（U/L）	57.14	118.75	114.88	84.92	74.28	70.00	12.84	0.08
脂蛋白酯酶 LPL/（U/L）	193.09	165.72	181.19	174.05	160.95	217.50	8.64	0.46
雷帕霉素靶蛋白 mTOR/（pg/mL）	16.11^{ab}	11.45^{b}	17.16^{ab}	12.93^{b}	19.36^{a}	12.56^{b}	0.87	0.04
p70 核糖体蛋白 S6 激酶 1 S6K1/（U/L）	18.84	18.69	26.78	17.72	23.18	17.48	1.16	0.10

3 讨　论

3.1 维生素 A 对 BMECs 内乳脂合成相关基因表达的影响

乳脂主要由 TG 组成，其含量约占所有乳脂成分的 98%。乳腺中从头合成及从血液吸收的挥发性脂肪酸在 BMECs 的内质网上合成 TG，随后形成大小不一的脂滴分泌至胞外[10]。本试验中，1.00、2.00 μg/mL 的维生素 A 增加了 BMECs 的 RGR 及 TG 含量，说明维生素 A 可以促进 BMECs 内乳脂的合成。*ACACA* 和 *FASN* 在 BMECs 内作用于乙酸和β-羟丁酸使其

从头合成中短链脂肪酸，乳中约 1/2 的 C16:0 和几乎全部的 C4:0~C14:0 依赖于乳腺的从头合成。ACACA 是脂肪酸合成第 1 阶段的限速酶，中链脂肪酸的合成则主要通过 *FASN*，且 *FASN* 会参与其碳链延长的整个过程。本试验结果表明，添加维生素 A 可提高 BMECs 内 *ACACA*、*FASN* 基因的表达量，说明维生素 A 可能促进了 BMECs 内脂肪酸的从头合成，引起 TG 含量的上升。张娜等[11]分析了不同乳品质奶牛乳腺中乳脂合成相关基因的表达，结果表明高乳品质奶牛的乳腺中 *FASN* 基因的表达量低于低乳品质的奶牛，而二者的 ACACA 活性无显著差异，表明 ACACA 虽然是脂肪酸从头合成的重要限速酶，但酶活性却不是影响乳中脂肪含量的主要因素。在本试验中，维生素 A 提高了 BMECs 中 TG 含量，但其促进浓度和 *ACACA*、*FASN* 基因表达的不一致，说明 TG 含量的增加可能不是完全通过促进脂肪酸的从头合成来实现的，具体原因还有待于进一步研究。*PPARG*、*SREBP*1 分别属于核转录因子家族和核激素受体家族中的配体激活受体，二者作为脂肪合成基因网络中重要的转录调控因子，都能直接调控 *ACACA*、*FASN*、*SCD*、*LPL* 等靶基因，进而调节脂肪酸的转运、合成及去饱和过程。脂肪合成相关基因的表达量和酶活性都是调控反刍动物乳脂分泌的重要因素[12]，长链脂肪酸进入 BMECs 后需要去饱和[13]。SCD 则是催化饱和脂肪酸形成单不饱和脂肪酸的关键限速酶，SCD 的催化产物是 TG 合成的重要组成部分。有研究表明，激活的 PPAR 可以和类维生素 A X 受体（retinoids X recepter，RXR）形成异源二聚体，然后和靶基因 *PPARG* 相互作用来调控基因的转录和表达，而维生素 A 的代谢产物 9-*cis* RA 是 RXR 的有效配体[14]。本试验结果得出，维生素 A 上调了 *PPARG*、*SREBP*1 和 *SCD* 基因表达的同时，也促进 *ACACA*、*FASN* 基因的表达，且 ACACA、FASN、SCD 活性与其靶基因的表达量也呈现相似的变化规律，提示添加维生素 A 增加了 BMECs 内的 TG 含量，可能与提高了 *PPARG*、*SREBP*1 的基因表达量进而上调其下游靶基因 *FASN*、*ACACA*、*SCD* 等脂肪酸合成相关酶的转录水平有关，但关于具体机制的研究报道甚少，需要进一步探讨。

本试验中，维生素 A 对 BMECs 内乳脂的合成与其浓度有关，1.00、2.00 μg/mL 的维生素 A 对细胞内 TG 含量促进效果较好；各浓度维生素 A 对 *FASN*、*ACACA*、*PPARG*、*SCD* 基因表达均有促进效果，*FASN*、*SREBP*1、*SCD* 基因表达量均以 0.05 和 0.10 μg/mL 维生素 A 组较高；*ACACA* 以 0.10 μg/mL 维生素 A 组增加效果最为明显；*PPARG* 尤以 1.00 μg/mL 上调作用最明显。2.00 μg/mL 的维生素 A 虽然对 TG 含量具有促进效果，但乳脂合成相关基

因表达量与对照组相比差异不显著。综合考虑，以 0.10 μg/mL 的维生素 A 对 BMECs 乳脂合成的促进作用较强。

3.2　维生素 A 对 BMECs 内乳蛋白合成相关基因表达的影响

乳蛋白主要由酪蛋白组成，约占 80%，包括 CSN1S1、CSN1S2、CSN2 和 CSN3，其中 CSN1S1 和 CSN3 是反映乳蛋白合成的主要蛋白质，其基因表达量可反映 BMECs 内乳蛋白的合成水平[15]。乳蛋白合成主要由 2 条信号通路来调控，分别是主要在 PRL 作用下从基因转录水平调控乳蛋白合成的 Juns 激酶（JAK）-信号转导转录激活因子（STAT）信号通路[16]和从蛋白质翻译水平起生乳调节作用的 mTOR 信号通路[17]。mTOR 属于磷脂酰肌醇激酶相关激酶超家族，是一种丝氨酸/苏氨酸激酶。在奶牛乳腺组织中，mTOR 信号通路能控制乳蛋白相关基因的翻译，S6K1 是 mTOR 的下游调节激酶，二者的磷酸化激活可促进 BMECs 内乳蛋白的合成。本试验结果表明，添加一定浓度的维生素 A 能显著提高 *CSN*1*S*1 和 *CSN*3 的基因表达量，同事显著提高 *STAT*5 的基因表达量。结果也得出，0.10 和 1.00 μg/mL 维生素 A 组的 *mTOR* 和 *eIF*4*E* 的基因表达量高于对照组，mTOR 含量和 S6K1 活性也有相似的变化规律，提示维生素 A 可能是通过 mTOR 信号通路使 mTOR 和 S6K1 激活从而促进乳蛋白合成。这些结果说明，维生素 A 对 *CSN*1*S*1 和 *CSN*3 基因表达有提高的作用可能与 mTOR 和 STAT5 信号通路有关，但相关研究鲜有报道，需要进一步研究。胰岛素样生长因子（IGF）系统是一类与胰岛素呈高度同源的多肽生长因子，RA 可以在不同的细胞系中引起 *IGF*-Ⅰ、*IGF*-Ⅱ及 IGF 结合蛋白（*IGFBP*）表达的变化[18]。何伯萍等[19]通过在分离培养的 BMECs 中添加不同浓度的 IGF-Ⅰ作用 24 h 后发现，IGF-Ⅰ能够显著促进 *CSN*2 和 *ACACA* 基因的表达，并且具有浓度依赖性，表明 IGF-Ⅰ可作为信号分子调节乳腺的泌乳功能。王皓宇等[20]研究发现，胰岛素处理 BMECs 24 h 可以显著上调细胞中 *CSN*2、*CSN*3、*STAT*5、*ACACA*、*FASN*、*SREBP*1 基因的表达。所以本试验中维生素 A 对乳脂、乳蛋白合成相关基因的影响也可能是通过提高 *IGF* 及 *IGFBP* 的表达来实现的，需要进一步研究。

本试验结果也得出，维生素 A 对 BMECs 内乳蛋白合成相关基因表达量的影响与其浓度有关。低浓度的维生素 A 对 BMECs 内乳蛋白合成的促进效果更好。0.05、0.10 μg/mL 维生素 A 能显著上调 *CSN*1*S*1 和 *mTOR* 基因表达，0.10、0.20 μg/mL 维生素 A 组则对 *CSN*3、*STAT*5

基因表达的促进作用更好，而高浓度 2.00 μg/mL 维生素 A 组均与对照组差异不显著。综合考虑，0.10 μg/mL 维生素 A 对 BMECs 内乳蛋白合成基因促进作用较好。

4 结 论

①维生素 A 可提高 BMECs 细胞活力和 TG 含量。

②维生素 A 能上调 BMECs 内乳脂合成相关基因 *FASN*、*ACACA*、*PPARG*、*SREBP*1、*SCD* 基因和乳蛋白合成相关基因 *CSN*1*S*1、*CSN*3、*STAT*5、*mTOR* 基因的表达，但其作用效果与其浓度有关。

③0.10 μg/mL 维生素 A 对乳脂、乳蛋白合成相关基因表达促进效果较好。

参考文献:

[1] 王文娟, 汪水平, 龚月生, 等. 日粮维生素 A 水平对肉牛牛肉品质的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2007, 35(8):75–81.

[2] ARNETT A M,DIKEMAN M E,SPAETH C W,et al.Effects of vitamin A supplementation in young lambs on performance,serum lipid,and longissimus muscle lipid composition[J].Journal of Animal Science,2007,85(11):3062–3071.

[3] 丁明岩.VA、VD 对两种规格斜带石斑鱼生长、饲料利用、脂肪代谢及 FAS、HL mRNA 表达量的影响研究[D].硕士学位论文.湛江:广东海洋大学,2015.

[4] OLDHAM E R,EBERHART R J,MULLER L D.Effects of supplemental vitamin A or β-carotene during the dry period and early lactation on udder health[J].Journal of Dairy Science,1991,74(11):3775–3781.

[5] 鲍宏云.过瘤胃保护维生素 A 对奶牛瘤胃发酵、产奶性能及免疫功能的影响[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2011.

[6] 郑永唐,贲昆龙.测定细胞存活和增殖的 MTT 方法的建立[J].免疫学杂志,1992,8(4):266–269.

[7] ZHOU Y,AKERS R M,JIANG H.Growth hormone can induce expression of four major milk protein genes in transfected MAC-T cells[J].Journal of Dairy Science,2008,91(1):100–108.

[8] BIONAZ M,LOOR J J.Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle[J].BMC Genomics,2008,9:366.

[9] 张养东.脂多糖对泌乳奶牛乳脂肪和乳蛋白影响及其机理研究[D].博士学位论文.哈尔滨:东北农业大学,2011.

[10] BAUMAN D E,MATHER I H,WALL R J,et al.Major advances associated with the biosynthesis of milk[J].Journal of Dairy Science,2006,89(4):1235–1243.

[11] 张娜,王小艳,李庆章,等.奶牛乳腺中调控乳脂合成关键基因表达分析[J].东北农业大学学报,2014,45(6):84–90.

[12] AHNADI C E,BESWICK N,DELBECCHI L,et al.Addition of fish oil to diets for dairy cows. Ⅱ.Effects on milk fat and gene expression of mammary lipogenic enzymes[J].The Journal of Dairy Research,2002,69(4):521–531.

[13] CHILLIARD Y,FERLAY A,MANSBRIDGE R M,et al.Ruminant milk fat plasticity:nutritional control of saturated,polyunsaturated,*trans* and conjugated fatty acids[J].Annales de Zootechnie,2000,49(3):181–205.

[14] 赵向利,张英杰.维生素 A 对动物基因表达的调控[J].饲料工业,2014,35(17):83–86.

[15] 常晨城.蛋氨酸及含蛋氨酸二肽对奶牛乳腺上皮细胞内乳蛋白合成相关基因表达的影响[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2015.

[16] BROCKMAN J L,SCHROEDER M D,SCHULER L A.PRL activates the cyclin D1 promoter Via the Jak2/Stat pathway[J].Molecular Endocrinology,2002,16(4):774–784.

[17] RIUS A G,APPUHAMY J A D R N,CYRIAC J,et al.Regulation of protein synthesis in mammary glands of lactating dairy cows by starch and amino acids[J].Journal of Dairy Science,2010,93(7):3114–3127.

[18] MONGAN N P,GUDAS L J.Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment[J].Differentiation,2007,75(9):853–870.

[19] 何伯萍,邢艳苹,雷连成,等.IGF-Ⅰ对奶牛乳腺上皮细胞合成乳脂、乳蛋白的影响[J].中国兽医学报,2012,32(8):1231–1234.

[20] 王皓宇,秦彤,郝海生,等.胰岛素对体外培养奶牛乳腺上皮细胞乳蛋白、乳脂肪合成相关基因 mRNA 表达的影响[J].畜牧兽医学报,2013,44(5):710–718.

Effects of Vitamin A on Gene Expressions Related to Milk Fat and Protein Synthesis in Bovine Mammary Epithelial Cells

SU Rui LIU Yang YAN Sumei* SHI Binlin ZHAO Yanli SHI Huiyu

(*College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot* 010018, *China*)

Abstract: This experiment was conducted to investigate the effects of vitamin A on gene expresions related to milk fat and protein synthesis in bovine mammary epithelial cells（BMECs). The experiment was designed as a single factor randomized trial, and the 3rd generation BMECs were randomly divided into 6 treatments with 6 replicates per group. After cultured in culture medium without serum for 24 h, cells in different treatments were cultured in culture medium supplemented with 0(control), 0.05, 0.10, 0.20, 1.00 and 2.00 μg/mL vitamin A for 24 h, respectively. The results showed that compared with the control group, 1.00 and 2.00 μg/mL vitamin A could significantly increase relative growth rate and triacylglycerols (TG) content（P<0.05）; vitamin A could significantly up-regulate expression levels of genes related to milk fat synthesis, such as peroxisome proliferator-activated receptor γ (*PPARG,* 0.05， 0.10, 0.20, 1.00 and 2.00 μg/mL), sterol regulatory element-binding protein 1 (*SREBP*1, 0.05 and 0.10 μg/mL), stearoyl-CoA desaturase (*SCD,* 0.05 and 0.10 μg/mL) （P<0.05）; vitamin A could significantly up-regulate expression levels of genes related to milk protein synthesis, such as signal transducers and activators of transcription 5 （*STAT*5, 0.20 μg/mL）, α-casein (*CSN*1*S*1, 0.05 and 0.10 μg/mL) and κ-casein (*CSN*3, 0.10 μg/mL) （P<0.05）; vitamin A could significantly increase acetylcoenzyme A (ACACA) activity（0.05， 0.10， 0.20 and 1.00 μg/mL) (P<0.05）, which was related to milk fat synthesis. In conclusion, vitamin A has concentration-dependent effects on expressions of genes related to milk fat and protein synthesis in BMECs, and the promotion effects of 0.10 μg/mL vitamin A are better.

Key words: vitamin A； milk fat； milk protein； gene expression

*Corresponding author, professor, E-mail: yansmimau@163.com (责任编辑 王智航)